

FUMIE SUZUKI KEMMELMEIER

VARIAÇÕES DAS ENZIMAS DO CICLO DO GLIOXILATO DURANTE
A GERMINAÇÃO EM GLYCINE MAX (L.) MERR.

Tese de Mestrado apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Paraná.

Curitiba 1977.

Tese orientada pela
Dra. Déa Amaral.

INDICE.

INTRODUÇÃO.	1
MATERIAIS E METODOS	7
1 Sementes.	7
2 Germinação.	7
3 Preparação do extrato livre de células.	7
4 Preparação das organelas celulares de cotilédones.	7
5 Preparação do gradiente de sacarose.	8
6 Ensaio enzimáticos.	9
6.1 Isocitrato liase.	9
6.2 Malato sintase.	9
7 Produtos das reações.	10
7.1 Identificação do glioxilato	10
7.2 Identificação do malato.	11
8 Análise estatística.	11
9 Determinação de proteínas.	12
10 Produtos químicos.	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO.	
1 Propriedades da isocitrato liase.	13
1.1 Efeito da concentração de enzima.	13
1.2 Efeito do pH.	13
1.3 Efeito da concentração de Mg^{++} .	13
1.4 Especificidade.	14
2 Propriedades da malato sintase.	14
2.1 Efeito da concentração de enzima.	14
2.2 Efeito do pH.	14
2.3 Efeito da concentração de Mg^{++} .	14
3 Produtos das reações.	14
3.1 Identificação do glioxilato.	14
3.2 Identificação do malato.	15
4 Fracionamento das organelas.	15
5 Atividade enzimática.	15

FIGURAS.

nº 1	Isocitrato liase: Efeito da concentração de enzima.	17
nº 2	Isocitrato liase: Efeito do pH.	18
nº 3	Isocitrato liase: Efeito da concentração de Mg^{++}	19
nº 4	Malato sintase: Efeito da concentração de enzima.	20
nº 5	Espectro de absorção do produto de reação da iso citrato liase.	21
nº 6	Gradiente de densidade de sacarose.	23
nº 7	Atividades específicas da isocitrato liase, em sementes de <u>Glycine max</u> (L.) Merr.	24
nº 8	Atividades específicas da malato sintase em sementes de <u>Glycine max</u> (L.) Merr.	25

TABELAS.

nº I	Incorporação do glioxilato 1 ^{14}C ao malato.	22
nº II	Atividades específicas da isocitrato liase em função do tempo de germinação.	26
nº III	Atividades específicas da malato sintase em função do tempo de germinação.	27

RESUMO.	28
---------	----

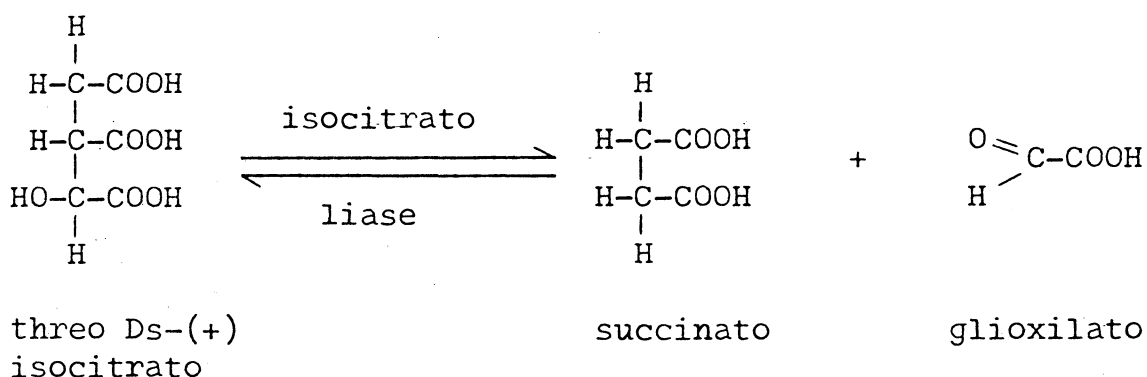
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	29
-----------------------------	----

AGRADECIMENTOS.	34
-----------------	----

INTRODUÇÃO

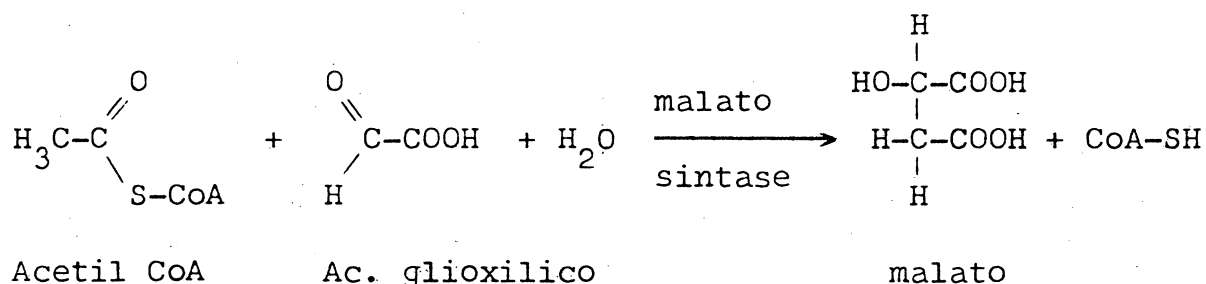
O ciclo do glioxilato, descrito em 1957 por KORNBERG e KREBS (1) em bactérias do gênero *Pseudomonas*, é uma forma modificada do ciclo do ácido tricarboxílico sendo a via pela qual constituintes celulares podem ser sintetizados a partir de unidades de dois carbonos. Esta via é constituída pela citrato sintase, aconitase, isocitrato liase, malato sintase e malato desidrogenase, sendo que a isocitrato liase (EC4.1.3.1.) e a malato sintase (EC4.1.3.2.) são as duas enzimas que contornam as etapas descarboxilativas do ciclo do ácido tricarboxílico e são específicas desta via. Estas duas enzimas são chamadas de enzimas anapleróticas (2).

A isocitrato liase foi primeiro demonstrada em 1953 por CAMPBELL, SMITH e EAGLES (3) em extrato livre de células de *Pseudomonas aeruginosa*, onde ocorria a formação de glioxilato e succinato quando adicionava-se citrato ou cis-aconitato como substrato. Esta descoberta foi confirmada em fungos e outras espécies de bactérias (4, 5, 6). O substrato verdadeiro da reação é o threo Ds-(+) isocitrato (7). A enzima requer adição de Mg^{++} e um composto sulfidrilico tal como: cisteína ou glutathione para sua atividade máxima (6). A enzima catalisa a seguinte reação:



A enzima de condensação do glioxilato com Acetil-CoA formando malato, foi demonstrada em extrato livre de células

de Escherichia coli, por WONG e AJL (8) em 1962 e denominada de malato sintase. Demonstraram também que esta enzima purificada cêrca de 50 vêzes necessitava de Mg^{++} e cisteína para sua atividade e catalisava a seguinte reação:



Em 1957, experimentos de BEEVERS (9) em fatias de endosperma de mamona (Ricinus communis L.) demonstraram a incorporação de ^{14}C em unidades de glucose da sacarose, a partir de acetato radioativo (acetato 1 e 2 ^{14}C). O autor sugeriu a participação do "ciclo do glioxilato" descrito em 1957 por KORNBERG e MADSEN (10) em *Pseudomonas*, como responsável pela conversão de gorduras a carboidratos em cotilédones.

KORNBERG e BEEVERS (11) em 1957 determinaram as atividades das enzimas do ciclo do glioxilato em sementes de Ricinus communis L (mamona) em germinação, demonstrando constituírem o elo de ligação entre a degradação de ácidos graxos e a síntese de açúcares durante a conversão de lipídeos à carboidratos. Estudos semelhantes em cotilédones de Arachis hypogea L.(amendoim) e Helianthus annus (girassol) em germinação por BRADBEER e STUMPF (12) no ano de 1959 mostraram a degradação de ácidos graxos e formação de açúcares com envolvimento do ciclo do glioxilato no processo.

CARPENTER e BEEVERS (13) em 1958 estudaram a distribuição da isocitrato liase em uma grande variedade de tecidos de plantas superiores, incluindo fôlhas, raízes, frutos, sementes sêcas e sementes em germinação. Verificaram traços de atividade enzimática em fôlhas de mamona, sementes de milho, ervilha em germinação e atividades mais altas em cotilédones ou en-

dospermas de sementes de melancia, algodão, mamona, abóbora, soja e amendoim em germinação.

YAMAMOTO e BEEVERS (14) em 1960 verificaram que a malato sintase era mais difundida do que a isocitrato liase nos tecidos de vegetais superiores e era encontrada em níveis enzimáticos diferentes. No entanto, as atividades enzimáticas mais altas ocorriam em sementes de mamona, soja, couve-flor, melancia, ervilha e amendoim em fase de germinação.

CARPENTER e BEEVERS (13) e YAMAMOTO e BEEVERS (14) foram os autores que verificaram a presença das enzimas isocitrato liase e malato sintase em sementes de soja.

Após o estudo da distribuição das enzimas isocitrato liase (13) e malato sintase (14) em vegetais superiores, vários trabalhos foram realizados relacionando o aparecimento destas enzimas nas sementes em germinação.

MARCUS e VELASCO (15) em 1960 verificaram que em sementes secas de amendoim, a isocitrato liase e malato sintase não apresentavam atividades. A isocitrato liase atingia atividade máxima no sexto dia de germinação, a qual em seguida decrescia rapidamente. Por outro lado a malato sintase apresentava atividade máxima em torno do sexto dia de germinação, mas esta atividade permanecia constante por mais alguns dias.

Evidências sobre a localização intracelular das enzimas do ciclo do glioxilato foram estudadas por vários autores. HOGG e KORNBERG (16) em 1963 apresentaram as primeiras evidências indicando a presença da malato sintase e isocitrato liase na fração mitocondrial de Tetrahymena pyriformis. Mais tarde MUELLER e HOGG (17) em 1967 concluíram que as enzimas do ciclo do glioxilato estavam localizadas nos peroxissomos de Tetrahymena pyriformis.

BREINDENBACH e BEEVERS (18) em 1967 imediatamente de mostraram em endosperma de sementes de mamona, através de centrifugação em gradiente de densidade de sacarose, que as enzimas do ciclo do glioxilato estavam presentes em organelas que sedimentavam-se à densidade de $1,25 \text{ g/cm}^3$ e não na fração mitocondrial (densidade de $1,17 \text{ g/cm}^3$). Estas organelas receberam o nome de glioxisomas para enfatizar a presença do ciclo do glioxilato.

GERHARDT e BEEVERS (19) em 1970 verificaram em sementes de mamona que as atividades específicas da isocitrato liase e malato sintase na fração glioxisomal separada por gradiente de densidade de sacarose aumentavam até o quinto dia de germinação e permaneciam constantes após este período.

LONGO e LONGO (20) em 1970 demonstraram em sementes de Arachis hypogea L. (amendoim), que as atividades da isocitrato liase e malato sintase eram pequenas até o terceiro dia de germinação e depois aumentavam rapidamente até o oitavo dia de germinação.

SCHNARRENBERGER, OESER e TOLBERT (21) em 1971 demonstraram que em sementes de Helianthus annuus L. (girassol) que a atividade máxima da isocitrato liase era alcançada no terceiro dia de germinação.

TRELEASE et alii (22) em 1971 verificaram em sementes de Cucumis sativus L. (pepino), que a isocitrato liase apresentava dois picos de atividade, uma atividade maior no quinto dia e uma atividade menor entre o sétimo e oitavo dia de germinação. Já a malato sintase também apresentava dois picos de atividade, uma atividade menor no 3º dia e uma maior no sétimo dia de germinação.

KAGAWA, MCGREGOR e BEEVERS (23) em 1973 verificaram que em sementes de Citrullus vulgaris, Schrad. (melancia) que a atividade máxima da malato sintase era alcançada no quarto

dia de germinação e que declinava rapidamente após este período.

Glioxisomas de cotilédones de algodão (Gossypium hirsutum L.), de pepino (Cucumis sativus L.), de amendoim (Arachis hypogea L.), de melancia (Citrullus vulgaris, Schrad.) e de megagametófitos de pinheiro (Pinus ponderosa Laws) foram comparados por HUANG (24) em 1975 e apresentaram todos a mesma densidade de equilíbrio de $1,25 \text{ g/cm}^3$ quando submetidos a centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.

HOLMAN (25) em 1948 mostrou em sementes de soja, que o conteúdo de lipídeos permanecia constante durante os dois primeiros dias de germinação, aumentava ligeiramente no terceiro dia e então diminuía durante o restante do tempo do experimento (18 dias). MCALISTER e KROBER (26) em 1951 confirmaram o trabalho de HOLMAN(25).

HOWELL(27) em 1961 estudando as características metabólicas da fração mitocondrial de soja durante a germinação, observou que o consumo de oxigênio aumentava até o quinto dia quando utilizava-se o succinato e alfa-cetoglutarato como substratos. Após este tempo, o consumo de alfa-cetoglutarato diminuiu rapidamente enquanto que o de succinato diminuía lentamente até o décimo quinto dia de germinação. O consumo de isocitrato aumentava lentamente atingindo o pico máximo no quinto dia, ocorria uma pequena diminuição no sexto dia, mantendo-se constante até o décimo dia de germinação. O autor interpretou estes resultados como um indício do aparecimento do ciclo do glioxilato durante a germinação.

HUTTON e STUMPF (28) em 1969 mostraram que a degradação de ácidos graxos através da Beta-oxidação em sementes de mamona processava-se nos sistemas particulados, sendo mais efetiva nos glioxisomas do que nas mitocôndrias. Esta atividade Beta-oxidativa alcançava o máximo de atividade entre o terceiro e quarto dia de germinação. COOPER e BEEVERS (29) também

em 1969 chegaram a resultados semelhantes, embora a atividade Beta-oxidativa fôsse muito mais elevada nos glioxisomas e praticamente inexistente nas mitocôndrias.

O desenvolvimento da soja na fase de germinação depende do material de reserva armazenado nos cotilédones e neste período devem possuir um sistema metabolicamente ativo para realizar uma rápida mobilização da reserva alimentar (30).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o aparecimento das enzimas isocitrato liase e malato sintase durante a germinação em sementes de Glycine max(L.) variedades Bragg, Davis e Viçoja. A escolha destas variedades justifica-se por possuírem ciclos vegetativos diferentes (31), sendo as variedades Bragg e Davis classificadas como de ciclo precoce e a Viçoja como de ciclo semi-tardio para as condições climatológicas do Estado do Paraná.

MATERIAIS E METODOS.

1 - Sementes

As sementes de soja, Glycine max (L.) Merr., variedades Bragg, Davis e Viçoja foram cedidas pela Drª Elci Zappia do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná (I.B.P.T.)

2 - Germinação

Cinco (5) sementes de soja de cada variedade (equivalentes a 1g de peso) foram devidamente envoltas em papel de filtro umedecido com água e colocadas para germinar no escuro, à temperatura de 28°C e cerca de 80% de umidade relativa. Para os ensaios enzimáticos, cinco (5) sementes de cada variedade foram retiradas de 24 em 24 horas em processo contínuo até um total de 168 horas (sete dias).

3 - Preparação do extrato livre de células

Das sementes apenas os cotilédones foram utilizados, sendo lavados com água destilada, pesados e macerados em gral de porcelana, com igual peso de areia do mar previamente tratada com ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e água destilada. A massa celular foi suspensa em tampão HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina N'-2-etanosulfônico) 0,05 M com 1 mM de ditioeritritol pH 7,2. A suspensão obtida foi centrifugada a 16.000 x g por 20 minutos à 0-4°C em centrífuga refrigerada (International-Modelo PR 2). O sobrenadante obtido foi utilizado como fonte de enzimas.

4 - Preparação das organelas celulares dos cotilédones

Cem (100) cotilédones de sementes de soja, variedade Viçoja, no quinto (5º) dia de germinação, foram lavadas com á-

gua destilada, pesados e finamente cortados com lâmina de bar - bear. Em seguida foram suavemente macerados em gral de porcelana com igual peso de "glass beads" tipo 100-5005. O macerado foi suspenso em tampão HEPES 0,05 M contendo sacarose 0,8 M e 1 mM de ditioeritritol, pH 7,2. Esta suspensão foi filtrada através de gaze e o filtrado submetido a centrifugação por 10 minutos a 480 x g. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante novamente centrifugado por 30 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado (pellet) assim obtido foi suspenso em 5,0 ml. de solução de sacarose 32% contendo 1mM de ditioeritritol, pH 7,2.

5 - Preparação do gradiente de sacarose

As soluções de sacarose para gradiente foram preparadas em ditioeritritol 1 mM, pH 7,2. O gradiente foi constituído por uma solução de sacarose (56 ml) com concentração crescendo linearmente de 32 a 65%. O gradiente de sacarose foi feito no "Density Gradient Former" (Beckman) em tubos de nitrato de celulose (60 ml).

Sobre o gradiente linear de sacarose previamente formado foram cuidadosamente depositados 4 ml de suspensão do precipitado obtido na centrifugação de 12.000 x g. O gradiente foi centrifugado durante quatro horas a 48.000 x g (20.000 r.p.m.) usando rotor SW 25,2 em ultracentrífuga Beckman L 2-65 B. Após centrifugação, introduziu-se cuidadosamente no fundo do tubo de gradiente, uma agulha conectada ao condutor de polietileno, através do qual retiraram-se amostras de 1,6 ml. Todos os procedimentos foram efetuados entre 0-4°C.

A concentração de sacarose de cada fração foi determinada em refratômetro Bausch Lomb (Bausch & Lomb Inc., Scientific Instruments) a 25°C.

6 - Ensaaios enzimáticos

6.1 - Isocitrato liase

A atividade da isocitrato liase foi determinada pelo método de Bruce McFadden (32) por nós modificado. O sistema de incubação continha: 50,0 μ moles de tampão HEPES, pH 7,2 ; 3,0 μ moles de cisteína. HCl ; 1,0 μ mol de $MgCl_2$; extrato livre de células num volume final de 1,35 ml. Este volume foi pré-incubado por cinco (5) minutos à 30°C, a reação enzimática foi iniciada pela adição de 4 μ moles de DL-isocitrato de sódio completando o volume para 1,40 ml. Após 5 minutos a reação foi interrompida com a adição de 0,5 ml de ácido tricloroacético 10%. As proteínas foram removidas através centrifugação a 3.000 r.p.m. em uma centrífuga clínica durante cinco minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 0,2 ml de ácido oxálico 1 M e 0,05ml de fenilhidrazina 5%. A solução foi colocada em banho de água fervente por cinco minutos e depois em banho de gelo por três minutos. Em seguida foram adicionados 0,9 ml de ácido clorídrico 12 N e 0,05 ml de ferricianeto de potássio 25%. A absorbância do produto formado (glioxilato) foi lida a 520 nm após sete minutos em espectrofotômetro Beckman, modelo DU.2.

Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de glioxilato a partir do DL isocitrato por minuto a 30°C nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa como unidade de enzima por miligrama de proteína.

6.2 - Malato sintase

A atividade da malato sintase foi determinada medindo-se a liberação do Coenzima A SH do acetil CoA, quando o extrato foi incubado com o glioxilato e acetil CoA segundo o mé-

tudo de Ornston e Ornston (33) por nós modificado. O sistema de incubação continha: 50,0 μ moles de tampão HEPES, pH 7,2 ; 3,0 μ moles de $MgCl_2$; 0,5 μ moles de glioxilato de sódio; extrato livre de células e água num volume final de 0,40 ml. A reação foi iniciada com a adição de 0,2 μ moles de acetil CoA, completando o volume para 0,45 ml. A mistura foi incubada durante 5 minutos e o ensaio enzimático interrompido pela adição de 1 ml de uréia 6 M. Em seguida foram adicionados 0,05 ml de 5,5' Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) 0,01 M. Após cinco minutos, determinou-se a absorbância em 412 nm em espectrofotômetro Beckman modelo DU.2.

O coeficiente de extinção molar $13.600\text{ cm}^{-1},\text{mol}^{-1}$ a 412 nm, correspondente ao produto colorido formado, foi utilizado para determinar a atividade da malato sintase (34).

Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 μ mol de coenzima A por minuto à 30°C nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa como unidade de enzima por miligrama de proteína.

7 - Produtos das reações

7:1 - Identificação do glioxilato

Um dos produtos da reação catalisada pela isocitrato liase foi identificado como glioxilato através do espectro de absorção de sua fenilhidrazona. As condições e o mesmo sistema de incubação do ensaio enzimático foram mantidos até a formação da fenilhidrazona do ácido glioxílico em banho de água fervente. O espectro de absorção da fenilhidrazona foi determinado em vários tempos de incubação enzimática (1, 3, 5, e 8 minutos) para formação do produto. Um padrão de glioxilato (0,05 μ moles) foi igualmente tratado e seu espectro de absorção determinado. Os espectros de absorção foram determinados em espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635 D, com velocidade de varredura de 50 nm/min e velocidade de papel de 3,33 cm/min.

7.2 - Identificação do malato

O produto da reação catalisada pela malato sintase foi identificado isotopicamente pela condensação do glioxilato $1-^{14}\text{C}$ de sódio com acetil CoA, conforme método descrito por Wegener et al (35). O sistema de incubação continha : 50 μmoles de tampão HEPES, pH 7,2 ; 1 μmol de MgCl_2 ; 0,2 μmoles de glioxilato de sódio; 0,008 μmoles de glioxilato $1-^{14}\text{C}$ de sódio (0,10 μCi) ; 0,5 μmoles de acetil CoA ; 0,04 ml de extrato livre de células (1,45 mg de proteína) e água completando o volume da mistura de incubação para 0,6 ml. O sistema foi incubado durante 5 minutos a 30°C e paralelamente foram realizados dois controles: um sistema completo com enzima inativada e outro com enzima ativa e sem acetil CoA.

Para determinar a incorporação do glioxilato $1-^{14}\text{C}$ em malato, produto de reação, 10 μmoles de ácido málico como carreador, foram adicionados à amostra a ser cromatografada. Esta solução foi cromatografada em papel Whatman nº 1 usando como solvente: n-butanol ; ácido fórmico e água (5:1:1 v/v), por 8 horas em técnica cromatográfica ascendente. Um padrão (10 μmoles) de ácido málico foi corrido no mesmo cromatograma. A parte do cromatograma, correspondente ao padrão foi cortada e revelada com anilina-xilose em metanol (36). O restante do cromatograma, contendo a amostra radioativa foi cortado em segmentos de 10 x 20 mm e colocados em frascos contendo 10 ml de líquido de cintilação (0,4% de PPO e 0,012% de POPOP em toluol) e posteriormente contados em contador de cintilação líquida Beckman, modelo LS-133. O produto da reação foi localizado pela radioatividade e seu R_f foi idêntico ao do padrão de ácido málico.

8 - Análise estatística

Foram feitos análise de variância e teste de Duncan

a nível de significância de 5% de probabilidade (37) para as enzimas isocitrato liase e malato sintase entre as sementes de soja, variedades Bragg, Davis e Viçôja, em diferentes tempos de germinação.

9 - Determinação de proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry et alii (38), utilizando-se sôro albumina bovina como padrão.

10 - Produtos químicos

S-Acetil-CoA sal sódico, DL isocitrato de sódio, threo-Ds-(+) isocitrato monopotássico, ácido glioxílico sal sódico, albumina bovina cristalizada, ácido málico, HEPES (ácido N-2 hidroxietilpiperazina N'-2 etanosulfônico), ditioeritrol, Dowex-50 W (H^+) 200-400 mesh, foram produtos fornecidos pela Sigma Chemical Company, St. Louis. Missouri. U.S.A.

Glioxilato $1-^{14}C$ de sódio, produto fornecido pela Amersham Searle, Illinois, U.S.A.

5.5'-Ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) foi produto fornecido pela Calbiochem, San Diego, Califórnia, U.S.A.

Cloridrato de L (+) cisteína, ferricianeto de potássio, cloridrato de fenilhidrazina, cloreto de magnésio, ácido oxálico, ácido tricloroacético, toluol, foram produtos fornecidos pela E. Merck, Darmstadt, República Federal da Alemanha.

"Glass beads" tipo 100-5005, foi produto obtido da Minnesota Mining & Manufacturing Company, St. Paul, Minnesota U.S.A.

PPO = 2,5 difeniloxazol e POPOP = 1,4-Bis 2 (metil-5-feniloxazol)-benzeno, foram obtidos da Beckman, Palo Alto, Califórnia, U.S.A.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades da isocitrato liase e malato sintase foram estudadas em extrato livre de células de cotilédones de soja, variedade Viçosa, no quinto dia de germinação:

1 - Propriedades da Isocitrato Liase

1.1.- Efeito da concentração de enzima

O efeito da concentração de enzima é mostrado na figura nº 1. A figura mostra proporcionalidade entre a velocidade de formação de glioxilato e as concentrações de enzima usadas.

1.2 - Efeito do pH

O comportamento da enzima em função da variação de pH é mostrado na figura nº 2. Foi utilizado apenas tampão HEPES, porque ocorreu interferência dos sistemas tampões sobre a atividade enzimática (tampões imidazol e fosfato). O pH ótimo de atividade enzimática foi em torno de pH 7,2. A isocitrato liase purificada de Pseudomonas indigofera (39) apresentou pH ótimo em 7,9 em tampão TRIS e a de Ricinus communis L. (mamona) em pH 7,5 (13).

1.3 - Efeito da concentração de Mg^{++}

A figura nº 3 mostra o efeito da concentração de Mg^{++} . O ion Mg^{++} aumentou a atividade da isocitrato liase até a concentração de 0,7 mM, sendo que concentrações superiores foram inibidoras. Este comportamento é o mesmo da isocitrato liase de Pseudomonas indigofera (39) e em Ricinus communis (13) o ion Mg^{++} atua apenas como ativador.

1.4 - Especificidade

As atividades específicas em função dos dois substratos utilizados, DL isocitrato e threo-Ds(+) isocitrato foram 0,044 e 0,041 respectivamente. Tanto em Pseudomonas aeruginosa (40) como em Pseudomonas indigofera (39) o único substrato foi o threo-Ds(+) isocitrato.

2 - Propriedades da Malato sintase

2.1 - Efeito da concentração de enzima

A figura nº 4 ilustra o aumento da velocidade de reação com a concentração de enzima até a concentração em torno de 0,085 mg de proteína, nas condições de ensaio.

2.2 - Efeito do pH

A malato sintase apresentou pH ótimo em torno de 7,0, ao contrário da malato sintase de endosperma de Ricinus communis (L.) (14), cuja atividade ótima estava situada num intervalo mais amplo de pH (6,8 a 8,0).

2.3 - Efeito da concentração de Mg^{++}

O ion Mg^{++} na concentração de 0,5 mM aumenta a atividade da malato sintase em extrato livre de células em cerca de quatro vezes.

3 - Produtos de reação

3.1 - Identificação do glioxilato

A figura nº 5 mostra o espectro de absorção da fe -

nilhidrazona do ácido glioxílico e os espectros de absorção da fenilhidrazona do produto de reação acumulado em diferentes tempos de incubação enzimática. O espectro de absorção sugere ser o glioxilato o produto da reação da isocitrato liase.

3.2 - Identificação do malato

A tabela nº I mostra a incorporação do glioxilato $1-^{14}\text{C}$ em malato, produto da reação da malato sintase. O malato foi identificado através de sua mobilidade cromatográfica comparada com o padrão de ácido málico.

4 - Fracionamento das organelas

A distribuição das atividades de isocitrato liase e malato sintase em gradiente linear de densidade de sacarose é mostrado na figura nº6. A isocitrato liase e malato sintase, apresentaram um pico de atividade máxima na densidade de equilíbrio de $1,25 \text{ g/cm}^3$. A concentração máxima de proteína ocorreu na densidade de $1,17 \text{ g/cm}^3$. Também atividades das duas enzimas foram verificadas no topo do gradiente. A presença destas enzimas nesta fração é provavelmente decorrente do rompimento dos glioxisomas durante a preparação das organelas, como foi sugerido anteriormente por GERHARDT e BEEVERS (19).

Os glioxisomas de cotilédones de soja, como indicado pela presença da isocitrato liase e da malato sintase, apresentaram uma densidade de equilíbrio de $1,25 \text{ g/cm}^3$, idêntica as densidades de equilíbrio reportadas para glioxisomas de outras espécies de vegetais por HUANG (24).

5 - Atividades enzimáticas em cotilédones em função do tempo de germinação

A atividade da isocitrato liase em sementes secas e

durante as primeiras 24 horas de germinação no escuro, foi muito baixa. A partir das 24 horas, ocorreu aumento da atividade enzimática até o final do experimento (168 horas). Este comportamento, o qual reflete o aparecimento da enzima durante a germinação foi o mesmo para as três variedades de sementes de soja listadas na figura nº 7

Quanto a malato sintase, o comportamento foi semelhante ao da isocitrato liase, sendo que a atividade máxima ocorreu em 144 horas, vindo a declinar em 168 horas de germinação. Fig. 8.

Através da análise de variância observou-se que ocorreram diferenças significativas nas atividades específicas de isocitrato liase em 96 horas de germinação. O teste de Duncan mostrou que estas diferenças de atividades específicas da isocitrato liase eram devidas as variedades Bragg (ciclo precoce) e Viçosa (ciclo semi-tardio) para os tempos de 24, 48, 96 horas de germinação (tabela II).

Não foram detectadas diferenças significativas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade (tabela III) nas atividades específicas da malato sintase entre as variedades de sementes de soja analisadas.

As diferenças das atividades específicas foram significativas a nível de 5% de probabilidade apenas em determinados tempos de germinação, portanto estes dados são insuficientes para caracterizar as variedades de sementes de soja testadas em função dos níveis enzimáticos de isocitrato liase e malato sintase.

O presente trabalho demonstra a indução das atividades de isocitrato liase e malato sintase, enzimas características do ciclo do glioxilato durante a germinação, bem como a localização intracelular destas enzimas nos glioxisomas.

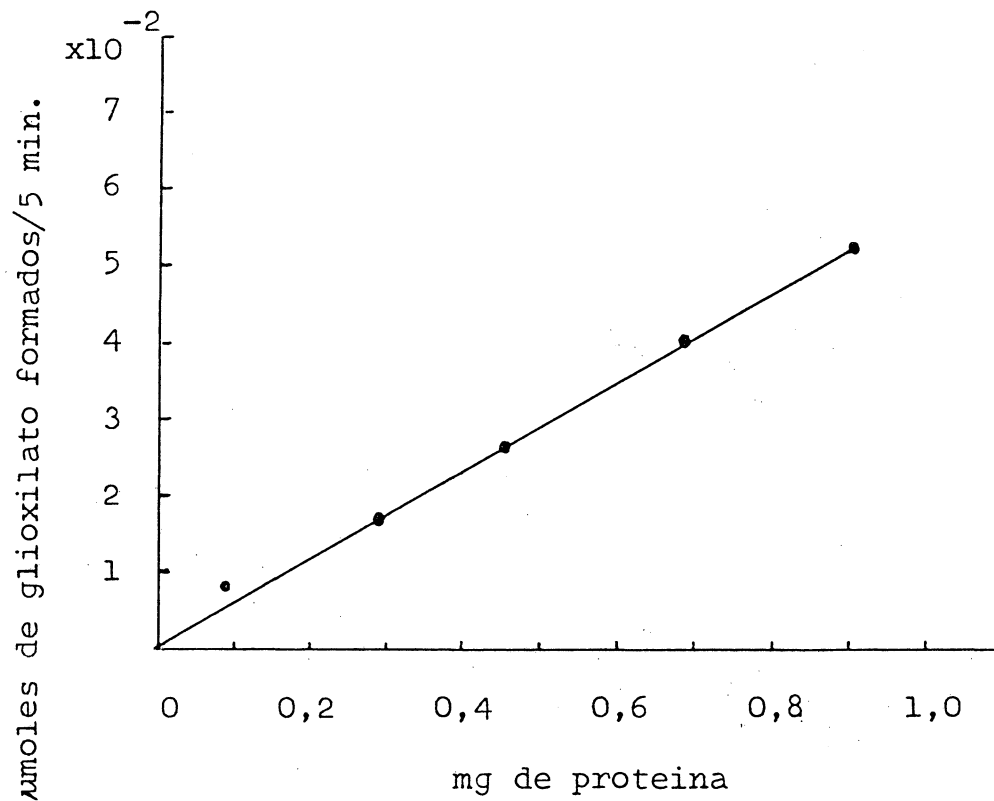


Figura nº 1 Efeito da concentração de isocitrato liase na velocidade de reação. A atividade de isocitrato liase foi determinada como descrito em materiais e métodos.

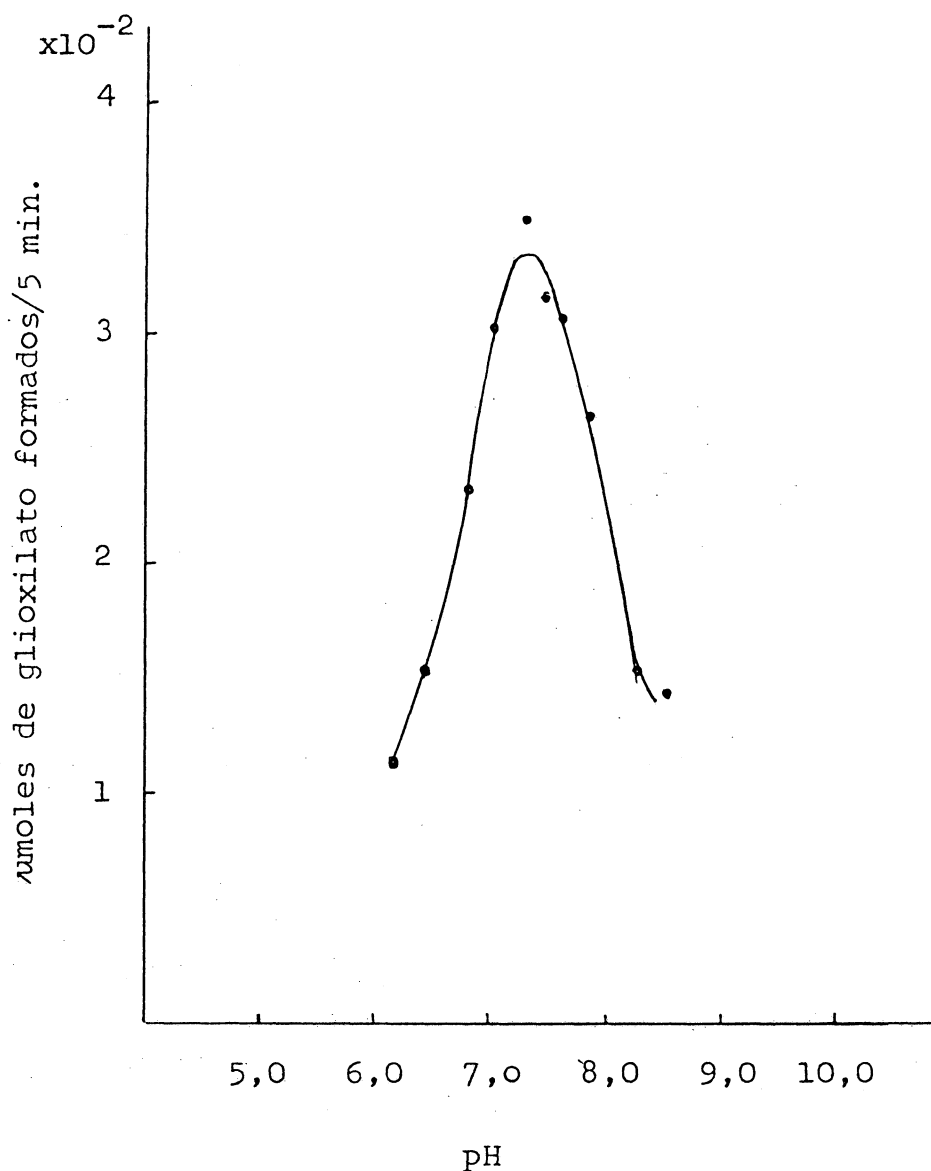


Figura nº 2. Efeito do pH sôbre a atividade da isocitrato. O sistema de incubação continha: 100 μmoles de tampão HEPES; 3,0 μmoles de cisteína.HCl ; 1,0 μmol de MgCl₂ ; 4,0 μmoles de DL isocitrato de sódio ; 0,54 mg de proteína e água destilada, volume final de 1,40 ml, e foi incubado durante 5 minutos a 30°C e o glioxilato foi determinado conforme descrito em materiais e métodos.

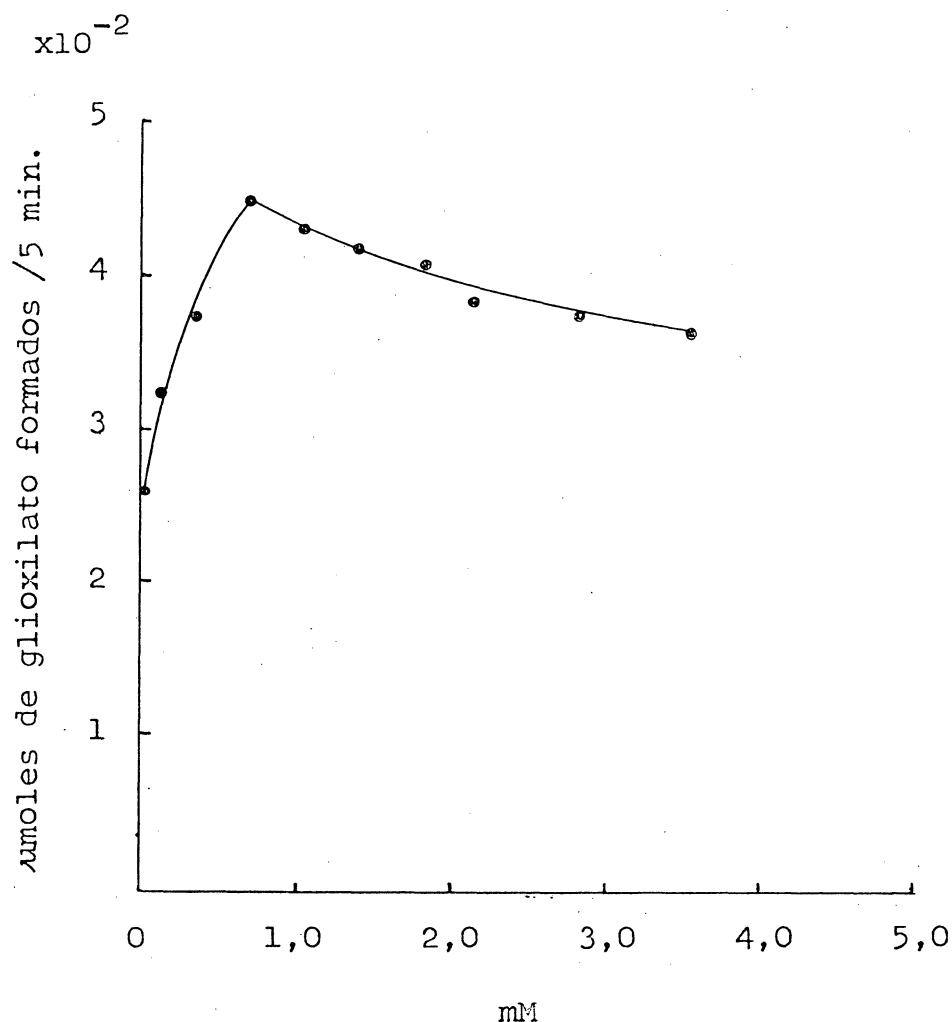


Figura nº 3. Efeito da concentração de Mg^{++} sobre a velocidade de reação da isocitrato liase. O sistema de incubação continha: 50,0 µmoles de tampão HE PES, pH 7,2 ; 3,0 µmoles de cisteína.HCl ; 4,0 µmoles de DL isocitrato de sódio, quantidades variáveis de Mg^{++} ; 0,75 mg de proteína e água destilada num volume final de 1,40 ml, e foi incubado durante 5 minutos a 30°C.

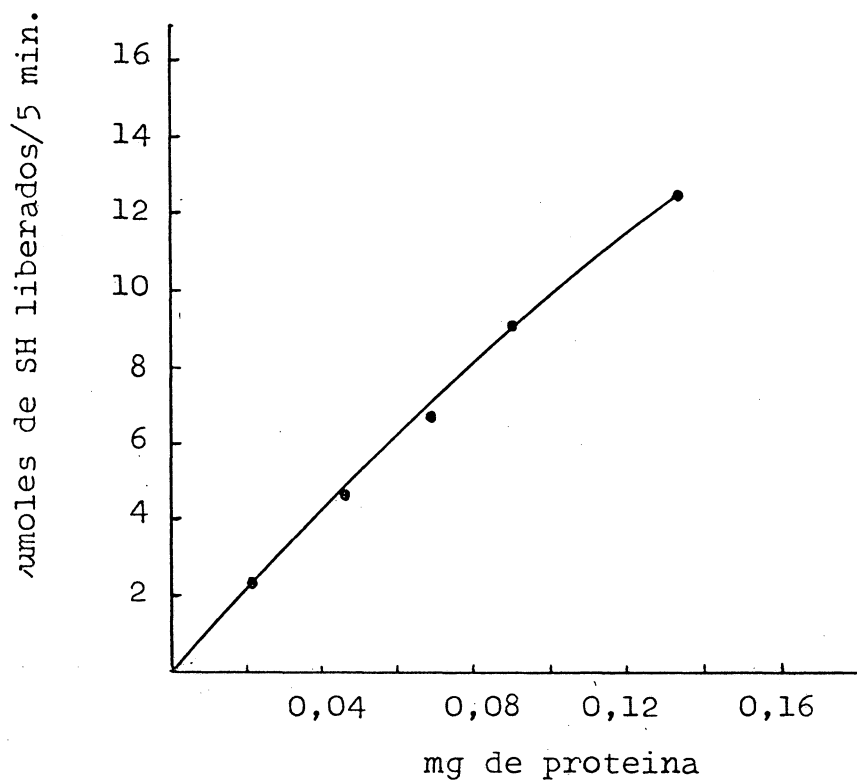


Figura nº 4 Efeito da concentração de malato sintase sôbre a velocidade de reação. O sistema de incubação continha: 50,0 μ moles de tampão HEPES, pH 7,5; 3,0 μ moles de $MgCl_2$; 0,5 μ moles de glioxilato de sódio; 0,2 μ moles de acetil CoA ; quantidades variáveis de enzima e água destilada, completando o volume final para 0,45 ml. O sistema foi incubado por 5 minutos a 30°C.

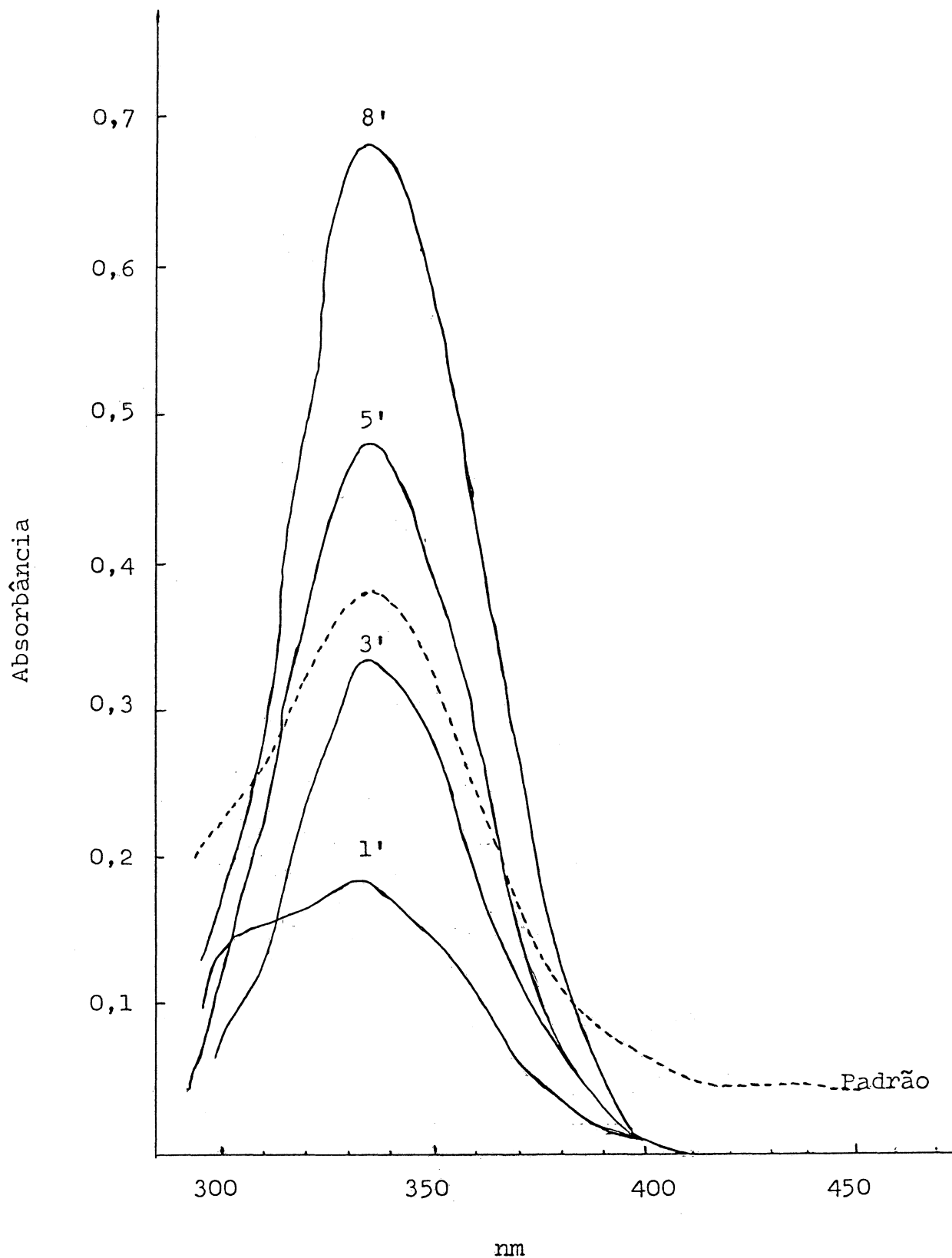


Figura nº 5: Espectro de absorção da fenilhidrazona do produto da reação da Isocitrato liase. O sistema de incubação para formação do produto é igual ao descrito em materiais e métodos. Nos tempos 1, 3, 5 e 8 minutos de incubação enzimática a reação foi interrompida com TCA 10% e o produto da reação foi tratado com fenilhidrazina. (32)

TABELA Nº I

INCORPORAÇÃO DO GLIOXILATO 1 -¹⁴C AO MALATO PELA MALATO SINTASE DE GLYCINE MAX (L.) MERR., VAR. VIÇÓJA.

Sistema de incubação	c.p.m.
Completo	8.210
Sem Acetil CoA.	1.023
Completo c/enzima inativada.	485

Sistema de incubação: 50 µmoles de tampão HEPES, pH 7,2 ; 1,0 µmol de MgCl₂ ; 0,2 µmoles de glioxilato de sódio ; 0,008 µmoles (0,10 µCi) de glioxilato 1 -¹⁴C de sódio; 0,5 µmoles de Acetil CoA ; extrato (1,45 mg de proteína), água destilada completando o volume para 0,6 ml.

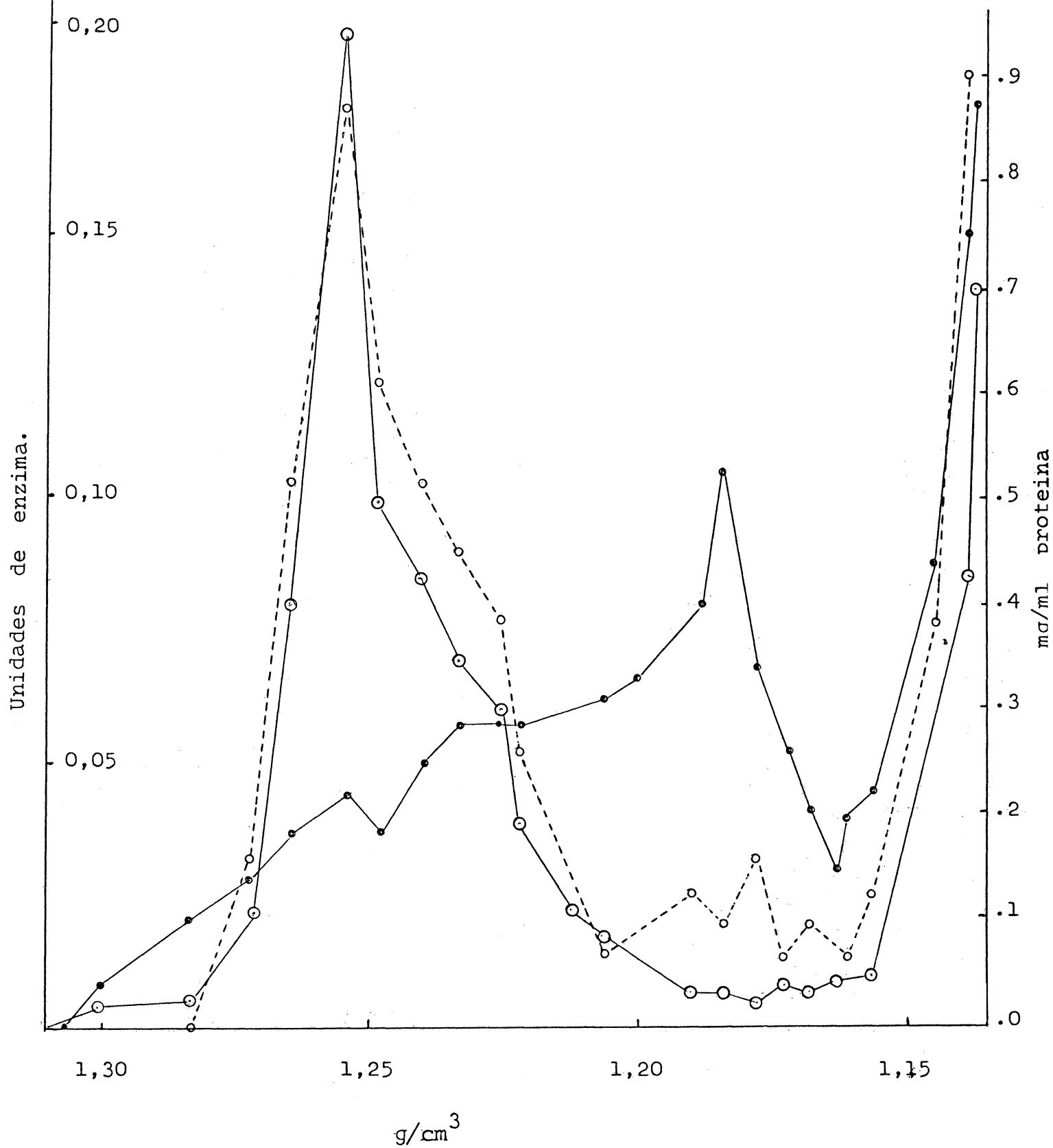


Figura nº 6 . Distribuição da Isocitrato liase, malato sintase e proteína em gradiente de densidade de sacarose. O gráfico ilustra a atividade da isocitrato liase (—○—), malato sintase (---○---) e proteína (—●—)

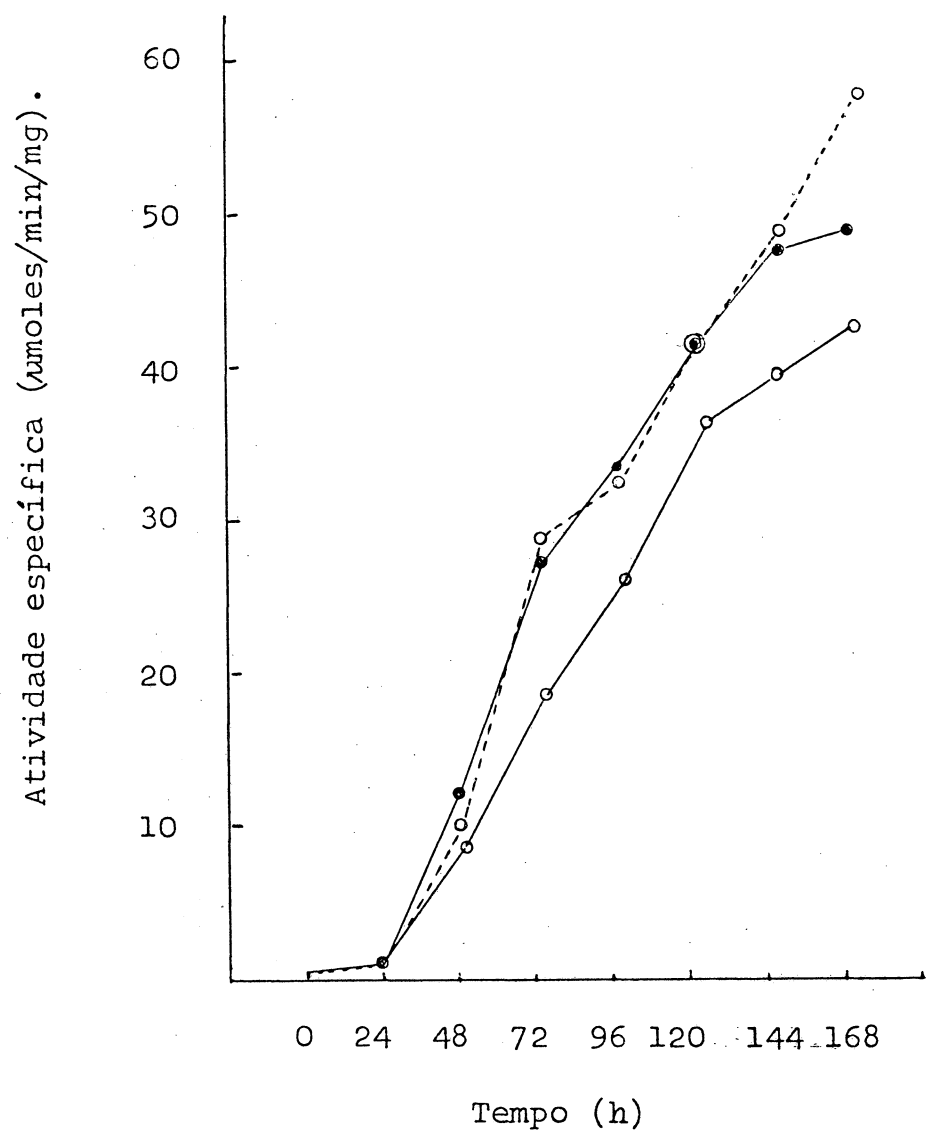


Figura nº 7 Variações na atividade específica de isocitrato liase durante germinação em Glycine max (L.) Merr., variedades Bragg (—○—), Davis (---○---) e Viçosa (—●—).

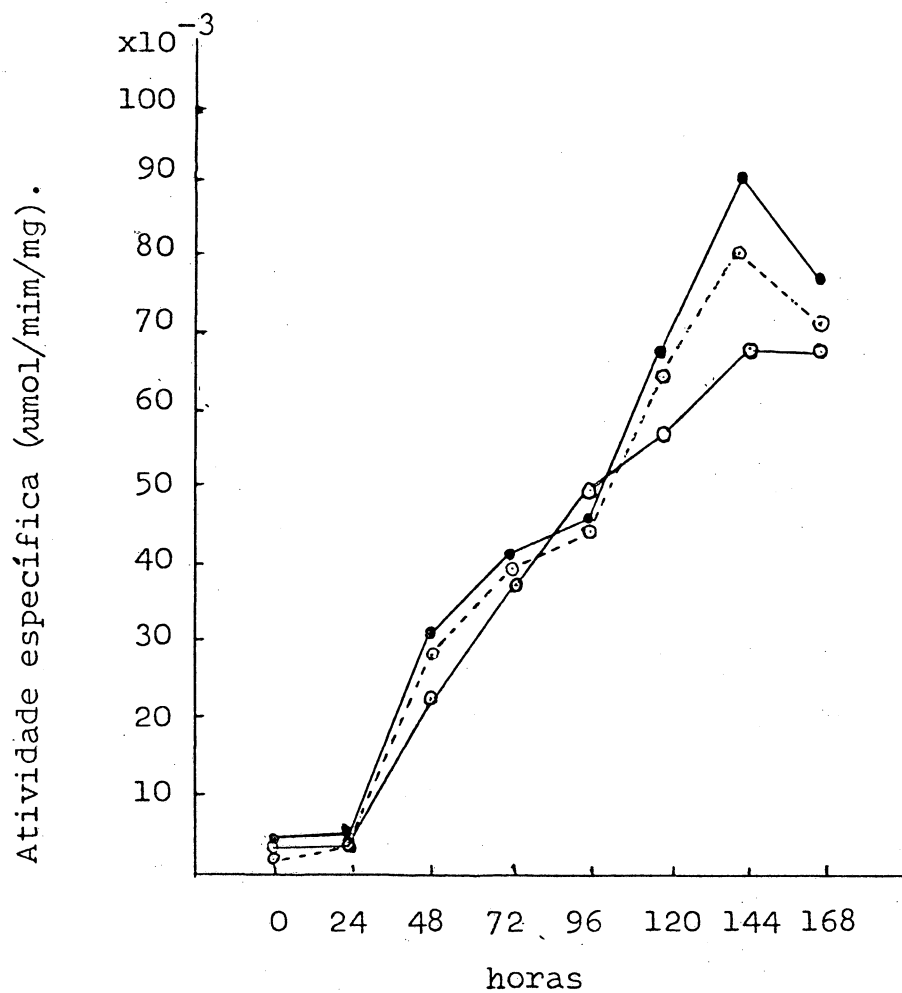


Figura nº 8. Variações na atividade específica de malato sintase durante germinação em Glycine max (L.) Merr., variedades Bragg (—○—), Davis (---○---) e Viçosa (—●—).

Tabela II. Atividades específicas da Isocitrato liase. Média de seis (6) dosagens em cotilédones de Glycine max (L.) Merr., variedades Bragg, Davis e Viçoja conforme tempo (horas) de germinação.

Variedades	Tempo(h) 0	24	48	72	96	120	144	168
	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$
Viçoja	0,215*a	0,889 a	11,700 a	27,143 a	34,666 a	41,080 a	46,933 a	47,990 a
Davis	0,172 a	0,562 ab	9,313 ab	28,098 a	31,999 ab	41,307 a	48,089 a	57,153 a
Bragg	0,178 a	0,400 b	8,117 b	18,981 a	25,081 b	36,594 a	39,343 a	41,550 a

TESTE DE DUNCAN a 5%. As variedades com mesma letra não diferem entre si e as letras diferentes, diferem estatisticamente.

Tabela III. Atividades específicas da Malato sintase. Média de quatro (4) dosagens em cotilédones de Glycine max (L.) Merr., variedades Bragg, Davis e Viçoja conforme tempo (horas) de germinação.

Tempo (h)	0	24	48	72	96	120	144	168
Variedades								
	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$
Viçoja	5,268*	5,582	31,914	42,351	46,488	63,853	90,105	77,347
Davis	3,636	6,254	29,566	39,442	44,360	59,946	80,416	70,295
Bragg	4,468	4,741	23,386	38,740	50,424	57,673	68,261	67,956

* Nos tempos acima estudados não foram detectados diferenças estatisticamente significativas através do teste de Duncan a 5%.

R E S U M O

As enzimas chaves do ciclo do glioxilato, isocitrato liase e malato sintase, foram demonstradas em sementes de Glycine max (L.) Merr., variedades Bragg, Davis e Viçoja. As atividades específicas das duas enzimas foram verificadas durante 168 horas de germinação. Foram observadas variações estatisticamente significativas no teor da isocitrato liase, entre as variedades Bragg e Viçoja nos tempos de 24, 48 e 96 horas de germinação. As diferenças entre as atividades de malato sintase das três variedades não foram estatisticamente significativas.

As propriedades gerais das duas enzimas foram demonstradas e glioxisomas foram isolados na densidade de 1,25 g/cm³ quando submetidos a centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - KORNBERG, H. L & KREBS, H. A. Synthesis of cell constituents from C_2 - units by a modified tricarboxilic acid cycle. Nature, 179: 988-991, 1957.
- 2 - KORNBERG, H. L. Anaplerotic sequences and their role in metabolism. In: Essays in Biochemistry, v. 2, London, Academic Press, 1966. p. 1-13.
- 3 - CAMPBELL, J. J. R., SMITH, R. A. & EAGLES, B. A. A deviation from the conventional tricarboxilic acid cycle in Pseudomonas aeruginosa. Biochem. Biophys. Acta. 11: 594, 1953.
- 4 - OLSON, J. A. The d-isocitric lyase system: The formation of glyoxylic and succinic acids from d-isocitric acid. Nature, 194: 695, 1954.
- 5 - SAZ, H. J. The enzymic formation of glyoxylate and succinate from tricarboxylic acids. Biochem. J., 58: XX, 1954.
- 6 - SMITH, R. A. & GUNSALUS, J. C. Isocitritase: a new tricarboxylic and cleavage system. J. Am. Chem. Soc., 76: 5002-5003, 1954.
- 7 - VICKERY, H. B. A suggested new nomenclature for the isomers of isocitric acid. J. Biol. Chem., 237: 1739-1741, 1962.
- 8 - WONG, D. T. O & AJL, S. J. Conversion of acetate and glyoxylate to malate. J. Amer. Chem., 78: 3230-3231, 1956.
- 9 - BEEVERS, H. Incorporation of acetate-carbon into sucrose in castor bean tissues. Biochem. J., 66 (2): 23P-24P, 1957.

- 10 - KORNBERG, H. L. & MADSEN, N. B. Synthesis of C_4 - dicarboxylic acids from acetate by a "glyoxylate bypass" of the tricarboxylic acid cycle. Biochem. Biophys. Acta, 24: 651-653, 1957.
- 11 - KORNBERG, H. L. & BEEVERS, H. The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor beans. Biochem. Biophys. Acta, 26: 531-537, 1957.
- 12 - BRADBEER, C. & STUMPF, P. K. Fat metabolism in higher plants. XI. The conversion of fat into carbohydrate in peanut and sunflower seedlings. J. Biol. Chem., 234 (3): 498-501, 1959.
- 13 - CARPENTER, W. D. & BEEVERS, H. Distribution and properties of isocitritase in plants. Plant Physiol., 34: 403-409, 1959.
- 14 - YAMAMOTO, Y. & BEEVERS, H. Malate synthetase in higher plants. Plant Physiol., 35: 102-108, 1960.
- 15 - MARCUS, A. & VELASCO, J. Enzymes of the glyoxylate cycle in germinating peanuts and castor beans. J. Biol. Chem., 235 (3): 563-567, 1960.
- 16 - HOGG, I. F. & KORNBERG, H. L. The metabolism of C_2 compounds in microorganisms. 9. Role of the glyoxylate cycle in protozoal glyconeogenesis. Biochem. J., 86: 462-468, 1963.
- 17 - MUELLER, M. & HOGG, J. F. Occurrence of protozoal isocitrate liase and malate synthetase in the peroxisome. Fed. Proc., 26(2): 284, 1967.
- 18 - BREINDENBACH, R. W. & BEEVERS, H. Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcelular particle from castor bean endosperm. Biochem. Biophys. Res. Commun., 27(4): 462-469, 1967.

- 19 - GERHARDT, B. P. & BEEVERS, H. Developmental studies on glyoxysomes in *Ricinus* endosperm. J. Cell Biol., 44 (1): 94-102, 1970.
- 20 - LONGO, C. P. & LONGO, G. P. The development of glyoxysomes in peanut cotyledons and maize scutella. Plant Physiol., 45: 249-254, 1970.
- 21 - SCHNARRENBERGER, C., OESER, A. & TOLBERT, N. E. Development of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean endosperm during germination. Plant Physiol., 48: 566-574. 1971.
- 22 - TRELEASE, R. N., BECKER, W. M., GRUBER, P. J. & NEWCOMB, E. H. Microbodies (glyoxysomes and peroxisomes) in cucumber cotyledons. Plant. Physiol., 48: 461-475, 1971.
- 23 -- KAGAWA, T., MCGREGOR, D. I. & BEEVERS, H. Development of enzymes in the cotyledons of watermelon seedlings. Plant Physiol., 51: 66-71, 1973.
- 24 - HUANG, A. H. Comparative studies of glyoxysomes from various fatty seedlings. Plant Physiol., 55: 870-874, 1975.
- 25 - HOLMAN, R. T. Lipoxidase Activity and fat-composition of germinating soy beans. Arch. Biochem., 17: 459-466. 1948.
- 26 - McALISTER, D. F. & KROBER, O. A. Translocation of food from soybean cotyledons and their influence on the development of the plant. Plant Physiol., 26(1-4): 525-538, 1951.
- 27 - HOWELL, R. W. Changes in metabolic characteristics of mitochondria from soybean cotyledons during germination. Physiol. Plant., 14: 89-97, 1961.

- 28 - HUTTON, D. & STUMPF, P. K. Fat metabolism in higher plants. XXXVII. Characterization of the Beta-oxidation systems from maturing and germinating castor bean seeds. Plant Physiol., 44: 508-516, 1969.
- 29 - COOPER, T. G. & BEEVERS, H. Beta-oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. J. Biol. Chem., 244 (13): 3514-3520, 1969.
- 30 - HOWELL, R. W. Physiology of the soy bean. In: Advances in Agronomy, vol XII, New York, Academic Press, 1960, p.266.
- 31 - SCOTT, W. O. & ALDRICH, S. R. Produccion moderna de la soja. Buenos Aires. Editorial H. Sur., 1975.p.16-20.
- 32 - McFADDEN. B. Isocitrate liase. In: COLOWICK, S. P. & KAPLAN, N. O. Methods in Enzimology, vol. XIII, New York, Acad. Press, 1969. p. 163-170.
- 33 - ORNSTON, L. N. & ORNSTON, M. K. Regulation of glyoxylate metabolism in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol., 98 (3): 1098-1108, 1969.
- 34 - ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 82: 70-77, 1959.
- 35 - WEGENER, W. S., REEVES, H. C. & AJL, S. J. An isotopic method for assaying the condensation of glyoxylate with acetyl-CoA and other short chain fatty-acid acyl CoA derivatives. Anal. Biochem., 11: 111-120, 1965.
- 36 - NORDMANN, J. & NORDMANN, R. Organic acids of the citric acid cycle and related acids. In: Smith, I. Chromatographic and Eletrophoretic Techniques. col. 1. London, Willian Heinemann, 1960. p. 272-290.

- 37 - MARKUS, R. Elementos de estatística aplicada. Porto Alegre. Faculdade de Agronomia e Veterinária da UFRGS. 1974. p. 129-148.
- 38 - LOWRY, O. H., ROSENBROUG, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R, J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- 39 - McFADDEN, B. & HOWES, W. V. Cristallization and some properties of isocitrate lyase from Pseudomonas indigofera. J. Biol. Chem., 238 (5): 1737-1742, 1963.
- 40 - OLSON, J. A. The purification and properties of yeast isocitric lyase. J. Biol. Chem., 234 (1-3): 5-10, 1959.

AGRADECIMENTOS.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, à coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, à Universidade Estadual de Londrina e à Universidade Estadual de Maringá, por possibilitarem a realização desta tese.

A todo pessoal do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração e amizade.

A Dr^a Glaci T. Zancan, Coordenadora do Curso de Pós Graduação em Bioquímica.

De modo especial à Dr^a Déa Amaral, pela orientação e apoio prestados durante a execução deste trabalho.